

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

jc997 U.S. PTO
 10/075460

 02/15/02

IN RE APPLICATION OF: Bettina MOECKEL et al.
 SERIAL NO: NEW APPLICATION
 FILED: HEREWITH
 FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE rpsL GENE

GAU:
 EXAMINER:

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
 WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

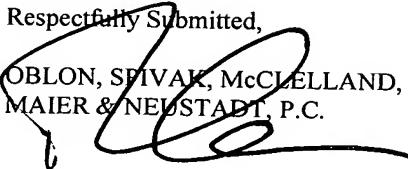
- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	101 07 230.9	FEBRUARY 16, 2001
GERMANY	101 62 386.0	DECEMBER 19, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- Number 101 07 230.9 is submitted herewith
- Number 101 62 386.0 will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number . Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
 - are submitted herewith
 - will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

 OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
 MAIER & NEUSTADT, P.C.

36379

Norman F. Oblon
 Registration No. 24,618

James J. Kelly, Ph.D.
 Registration No. 41,504



22850

Tel. (703) 413-3000
 Fax. (703) 413-2220
 (OSMMN 10/98)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



jc997 U.S. PRO
10/075460
02/15/02

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 07 230.9

Anmeldetag: 16. Februar 2001

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Neue für das rpsL-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. Januar 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Nietiedt

Neue für das rpsL-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das rpsL-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das rpsL-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

- Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.
- Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von

L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

10. Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

20. Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das rpsL-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

25. a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
30. SEQ ID No. 2,

- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

5 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des ribosomalen Proteins S12 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte

Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine

10 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
- 15 genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i), die die
- 20 Aktivität des Proteins/Polypeptides nicht verändern

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind schließlich Polynukleotide ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotide enthaltend mindestens 15

25 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1 und 499

b) Polynukleotide enthaltend mindestens 15

aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der

Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 500 und 883

- c) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der 5 Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 884 und 1775.

Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 10 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, 15 insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das rpsL-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die 20 erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon 25 enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die 30 für das ribosomale Protein S12 kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu

isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des rpsL-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu

5 detektieren und zu bestimmen

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das ribosomale Protein S12

10 kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende

15 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150,

20 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

25 sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu

30 wenigstens besonders 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%,

97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragmentes.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene

- 5 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des ribosomalen Proteins S12 und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt
10 zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

- 15 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-
20 Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das rpsL-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.
- 25 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene
30 erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann
- 5 sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.
- 10 Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme
- Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
- 15 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
- 20 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020
- und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme
- 25 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
30 *Corynebacterium glutamicum* DM58-1
Corynebacterium glutamicum DG52-5
Corynebacterium glutamicum DSM5714 und
Corynebacterium glutamicum DSM12866.

Das neue, für das ribosomale Protein S12 kodierende rpsL-Gen von C. glutamicum wurde isoliert.

Zur Isolierung des rpsL-Gens oder auch anderer Gene von C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses

- 5 Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt.
Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, 10 Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
- 15 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 20 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) (1992) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

- 25 Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in 30 gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren
- 35

subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

- 5 Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

- Die neue für das Gen rpsL kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des rpsL-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, daß wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins abspalten können.

- Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Derartige Mutationen werden unter anderem auch als neutrale Substitutionen bezeichnet. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können.

Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

- 10 In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschrifte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriften durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%

- 5 Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's 10 Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der 15 Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur 20 Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

- Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe 25 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

- 30 Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Verstärkung des rpsL-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die

Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des 5 Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.

10 Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin 15 eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei 20 Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei 25 Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift 30 JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße rpsL-Gen 35 beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden

überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554),
5 pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS
10 Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch
15 Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige
20 Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73
25 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994)). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf
30 et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode
35 der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994))

beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS 5 Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"- Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Es wurde weiterhin gefunden, dass Aminosäureaustausche in 10 dem Abschnitt zwischen Position 38 bis 48 der Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins S12 dargestellt in SEQ ID No. 2 die Lysinproduktion coryneformer Bakterien verbessern.

Vorzugsweise wird L-Lysin an der Position 43 gegen jede 15 andere proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Lysin ausgetauscht, wobei der Austausch gegen L-Histidin oder L-Arginin bevorzugt wird. Ganz besonders bevorzugt wird der Austausch gegen L-Arginin.

In SEQ ID No. 3 ist die Basensequenz des in Stamm DM1545 20 enthaltenen Allels rpsL-1545 dargestellt. Das rpsL-1545 Allel kodiert für ein Protein, dessen Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 4 dargestellt ist. Das Protein enthält an Position 43 L-Arginin. Die DNA Sequenz des rpsL-1545 Allels (SEQ ID No. 3) enthält anstelle der im rpsL Wildtypgen (SEQ 25 ID No. 1) an Position 627 enthaltenen Base Adenin die Base Guanin.

Für die Mutagenese können klassische Mutageneseverfahren unter Verwendung mutagener Stoffe wie beispielsweise N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder ultraviolettes Licht 30 verwendet werden. Weiterhin können für die Mutagenese in-vitro Methoden wie beispielsweise eine Behandlung mit Hydroxylamin (Miller, J. H.: A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory

- Press, Cold Spring Harbor, 1992) oder mutagene Oligonukleotide (T. A. Brown: Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993) oder die Polymerasekettenreaktion (PCR), wie sie im
- 5 Handbuch von Newton und Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994) beschrieben ist, verwendet werden.
- Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem rpsL-Gen eines oder mehrere
- 10 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphatzzyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.
- 15 So kann für die Herstellung von L-Lysin zusätzlich zur Verstärkung des rpsL-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- das für die Dihydridipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- 20 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 25 • das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- 30 • das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),

- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkina⁵se kodierende Gen lysC (Kalinowski et al., Molecular Microbiologie 5(5), 1197-204 (1991)),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE:
10 19959328.0, DSM 13115), und
- das für die β-Untereinheit der RNA-Polymerase B kodierende rpoB-Gen dargestellt in SEQ ID No. 5 und 6

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.
20

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des rpsL-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe
25

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),
30

- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),

- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

5 abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Verstärkung des *rpsL*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in:

10 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren 15 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel 20 (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den 25 Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

30 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren

wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 5 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und
- 10 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise

bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden
5 erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.
10

Eine Reinkultur des Corynebacterium glutamicum Stammes
15 DM1545 wurde am 16. Januar 2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikrorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) als DSM 13992 gemäß Budapest Vertrag hinterlegt.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen
20 Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

- Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische
25 Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.
30 Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomal DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

- 5 wird wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente werden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) 10 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 15 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wird mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase 20 dephosphoryliert.

Anschließend wird die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.

- Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wird mit der 25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wird anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) 30 in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) werden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der

Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank werden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert werden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des rpsL-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wird mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente werden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgt die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wird mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wird wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wird. Dieses Ligationsgemisch wird

anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 5 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgt mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgt nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings 10 of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wird der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.
15 Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgt in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, 20 Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten werden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate werden zu einem 25 zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wird mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergibt ein 30 offenes Leseraster von 383 Basenpaaren, welches als rpsL-Gen bezeichnet wird. Das rpsL-Gen kodiert für ein Protein von 127 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das rpoL-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000779 BT

<140>

10 <141>

<160> 6

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1775

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (500)..(880)

25 <223> rpsL-Wildtypgen

<400> 1

cagctctaca agagtgtcta agtggcgccc attccatgct ttggaggagc gatcttc 60

30 ttcctccaaa gtgagttgac ctcggaaac agctgcagaa agttcatcca cgacttggtt 120

tcggtaagg tcagtggcga gcttcttgc tggttcggtt cttgaggaa cagtcatggg 180

aaccattcta acaaggatt tggtgtttc tgccgcttagc tgataatgtg aacggctgag 240

35 tcccactctt gtagttggga attgacggca cctcgcactc aagcgcggta tcgcccc 300

ttttccggga cgcgggtggcg catgttgca ttgtatgagg ttgtccgtga catgtttgg 360

40 cgggccccaa aaagagcccc ctttttgct tgtctggaca cttttcaaa tccttcgcca 420

tcgacaagct cagccttcgt gttcgtcccc cggcgctcac gtcagcagtt aaagaacaac 480

tccgaaataa ggatggttc atg cca act att cag cag ctg gtc cgt aag ggc 532

Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly

45

1

5

10

cgc cac gat aag tcc gcc aag gtg gct acc gcg gca ctg aag ggt tcc 580
Arg His Asp Lys Ser Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser

15

20

25

50

cct cag cgt cgt ggc gta tgc acc cgt gtg tac acc acc acc cct aag 628
Pro Gln Arg Arg Gly Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Pro Lys

30

35

40

55

aag cct aac tct gct ctt cgt aag gtc gct cgt gtg cgc ctt acc tcc 676
Lys Pro Asn Ser Ala Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser

45

50

55

ggc atc gag gtt tcc gct tac atc cct ggt gag ggc cac aac ctg cag	724
Gly Ile Glu Val Ser Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln	
60 65 70 75	
5 gag cac tcc atg gtg ctc gtt cgc ggt ggt cgt gtt aag gac ctc cca	772
Glu His Ser Met Val Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro	
80 85 90	
10 ggt gtc cgt tac aag atc gtc cgt ggc gca ctg gat acc cag ggt gtt	820
Gly Val Arg Tyr Lys Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val	
95 100 105	
15 aag gac cgc aag cag gct cgt tcc ccg cta cgg cgc gaa gag ggg ata	868
Lys Asp Arg Lys Gln Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile	
110 115 120	
20 att aaa aat gcg taaatcagca gctcctaagc gtccagtagt tcaggaccct	920
Ile Lys Asn Ala	
125	
25 gtataacaagt ccgagctcgt tacccagctc gtaaacaaga tcctcatcg ggcaagaag	980
tccaccgcag agcgcattcgt ctacggtgca ctcgagatct gccgtgagaa gaccggcacc	1040
30 35 40 45 50	
5 gatccagtag gaa <u>c</u> ctcga gaagg <u>c</u> tc ggcaacgtgc gtccagacct cgaagttcgt	1100
tcccgcgtg ttggtggcgc tacctaccag gtgccagtagg atgttcgccc agagcgcgca	1160
aacaccctcg cactgcgtt gttggtaacc ttacccgtc agcgtcgtga gaacaccatg	1220
atcgagcgtc ttgcaaacga acttctggat gcagccaacg gccttggcgc ttccgtgaag	1280
cgtcgcgaag acacccacaa gatggcagag gccaaccgcg cttcgctca ctaccgctgg	1340
tagtactgcc aagacatgaa agcccaatca ctttaagat caacgcctgc cggccctt	1400
cacatttcaa taagctggca gcctgcgtt cttcaaggcg actggctt tagtctcatt	1460
aatgcagtcc accgctgtaa gatactaaa tagaaacact gttcggcag tgttacta	1520
aaaaatccat gtcacttgcc tcgagcgtgc tgcttgaatc gcaagtttgt ggcaaatgt	1580
aacaagagaa ttatccgtag gtgacaaact ttttaatact tggtatctg tcatggatac	1640
ccccgtataata aataagtgaa ttaccgtaac caacaagttt gggtaccact gtggcacaag	1700
aagtgcattaa ggatctaac aaggccgcac acatccgcac catggcgcac atcgatgt	1760
55 gtaagaccac gacca	1775
<210> 2	
<211> 127	
<212> PRT	
<213> Corynebacterium glutamicum	
<400> 2	
Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly Arg His Asp Lys Ser	
1 5 10 15	

Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser Pro Gln Arg Arg Gly
 20 25 30

5 Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Pro Lys Lys Pro Asn Ser Ala
 35 40 45

Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser Gly Ile Glu Val Ser
 50 55 60

10 Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln Glu His Ser Met Val
 65 70 75 80

15 Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro Gly Val Arg Tyr Lys
 85 90 95

Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val Lys Asp Arg Lys Gln
 100 105 110

20 Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile Ile Lys Asn Ala
 115 120 125

25 <210> 3

<211> 1775

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

30 <220>

<221> CDS

<222> (500)..(880)

<223> rpsL-Gen Allel 1545

35 <400> 3

cagctctaca agagtgtcta agtggcgccc attccatgct ttggaggagc gatcttcaaa 60

ttcctccaaa gtgagttgac ctcggaaac agctgcagaa agttcatcca cgacttggtt 120

40 tcggtaagg tcagtggcga gcttctttgc tggtcgttt ctttgagggaa cagtcatggg 180

aaccattcta acaaggatt tggtgttttc tgccgctagc tgataatgtg aacggctgag 240

tcccaactttt gtagttggga attgacggca cctcgcaactc aagcgcggta tcgccccctgg 300

45 ttttccggga cgcgggtggcg catgtttgca tttgatgagg ttgtccgtga catgtttgg 360

cgggccccaa aaagagcccc ctttttgcg tgtctggaca ctttttcaaa tccttcgcca 420

50 tcgacaagct cagccttcgt gttcgtcccc cgggcgtcac gtcagcagtt aaagaacaac 480

tccgaaataa ggatggttc atg cca act att cag cag ctg gtc cgt aag ggc 532

Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly
 1 5 10

55 cgc cac gat aag tcc gcc aag gtg gct acc gcg gca ctg aag ggt tcc 580

Arg His Asp Lys Ser Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser

15 20 25

	cct cag cgt cgt ggc gta tgc acc cgt gtg tac acc acc acc cct agg	628
	Pro Gln Arg Arg Gly Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Pro Arg	
	30 35 40	
5	aag cct aac tct gct ctt cgt aag gtc gct cgt gtg cgc ctt acc tcc	676
	Lys Pro Asn Ser Ala Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser	
	45 50 55	
10	ggc atc gag gtt tcc gct tac atc cct ggt gag ggc cac aac ctg cag	724
	Gly Ile Glu Val Ser Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln	
	60 65 70 75	
15	gag cac tcc atg gtg ctc gtt cgc ggt ggt cgt gtt aag gac ctc cca	772
	Glu His Ser Met Val Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro	
	80 85 90	
	ggt gtc cgt tac aag atc gtc cgt ggc gca ctg gat acc cag ggt gtt	820
	Gly Val Arg Tyr Lys Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val	
	95 100 105	
20	aag gac cgc aag cag gct cgt tcc ccg cta cg ^g cgc gaa gag ggg ata	868
	Lys Asp Arg Lys Gln Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile	
	110 115 120	
25	att aaa aat gcg taaatcagca gctcctaagc gtccagtagt tcaggaccct	920
	Ile Lys Asn Ala	
	125	
30	gtataacaagt ccgagctcg ^t tacccagctc gtaaacaaga tcctcatcg ^g tgccaagaag	980
	tccaccgcag agcgcac ^t ctacggtgca ctcgagatct gccgtgagaa gaccggcacc	1040
	gatccagtag gaaccctcg ^a gaaggctctc ggcaacgtgc gtccagacct cgaagttcg ^t	1100
35	tcccgcgt ^g ttggtggcgc tacctaccag gtgccag ^t atgttcgccc agagcgcgca	1160
	aacaccctcg cactgcgtt ^g gttggtaacc ttcacccgtc agcgtcgtga gaacaccatg	1220
40	atcgagcg ^t ttgcaa ^{ac} acttctggat gcagccaacg gccttggcgc ttccgtgaag	1280
	cgtcg ^{ca} acacccacaa gatggcagag gccaaccgcg cttcgctca ctaccgctgg	1340
	tagtactgcc aagacatgaa agcccaatca ccttaagat caacgcgtc cggccccc ^t	1400
45	cacattt ^g aatggcgttt cttcaaggcg actggc ^{ttt} tagtctcatt	1460
	aatgcagt ^t ccgcgt ^{aa} gatagctaaa tagaaacact gttcggcag tgtgttacta	1520
50	aaaaatccat gtcacttgcc tcgagcgtgc tgcttgaatc gcaagttagt ggcaaaatgt	1580
	aacaagagaa ttatccgt ^g gtgacaaact ttttaatact tggtatctg tcatggatac	1640
	cccg ^{tt} aataagt ^g aa ttaccgt ^{aa} caacaagtt ^g ggttaccact gtggcacaag	1700
55	aagtgc ^{tt} aac gatctaaac aagg ^t ccgca acatcg ^{cc} catggcgcac atcgatgctg	1760
	gtaagaccac gacca	1775

<210> 4
<211> 127
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

5 <400> 4
Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly Arg His Asp Lys Ser
 1 5 10 15

10 Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser Pro Gln Arg Arg Gly
 20 25 30

 Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Pro Arg Lys Pro Asn Ser Ala
 35 40 45

15 Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser Gly Ile Glu Val Ser
 50 55 60

20 Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln Glu His Ser Met Val
 65 70 75 80

 Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro Gly Val Arg Tyr Lys
 85 90 95

25 Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val Lys Asp Arg Lys Gln
 100 105 110

 Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile Ile Lys Asn Ala
 115 120 125

30

 <210> 5
35 <211> 5099
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

40 <220>
 <221> CDS
 <222> (702)..(4196)
 <223> rpoB-Gen

 <400> 5
45 acaatgtgac tcgtgatttt tgggtggatc agcgtaccgg tttgggtgtc gatctagctg 60
 aaaatattga tgattttac ggcgaccgca gcggccagaa gtacgaacag aaattgcttt 120
 tcgacgcctc cctcgacgat gcagctgtct ctaagctggt tgcacaggcc gaaagcatcc 180
50 ctgatggaga tgtgagcaaa atcgcaaata ccgttaggtat tgtgatcggt gcggtattgg 240
 ctctcgtggg cctggccggg tgaaaaaaa cgaaaaaa gaaacgtcga gaagcttaac 300
 ctgctgttca aatagatttt ccctgtttcg aattgcggaa accccgggtt tgaaaatgg 360
55 gggcctcgat agaagggttc aagaagattt ctggaaacg cgccccgtgcg gttgggttgct 420
 aatagcacgc ggagcaccag atgaaaaatc tcccccttac ttccgcgcgc gattggata 480

ctctgagtcg ttgcgttgg aattcgtgact cttttcggtt cctgtacgc caagaccgg 540
 atcaagggtgg tttaaaaaaaaa ccgatttgac aaggtcattc agtgctatct ggagtcgttc 600
 5 agggggatcg gttccctcag cagaccaattt gctaaaaat accagcgggtt ttgatctgca 660
 cttaatggcc ttgaccagcc aggtgcaattt accccgcgtga g gtg ctg gaa gga ccc 716
 Val Leu Glu Gly Pro
 1 5
 10 atc ttg gca gtc tcc cgc cag acc aag tca gtc gtc gat att ccc ggt 764
 Ile Leu Ala Val Ser Arg Gln Thr Lys Ser Val Val Asp Ile Pro Gly
 10 15 20
 15 gca ccg cag cgt tat tct ttc gcg aag gtg tcc gca ccc att gag gtg 812
 Ala Pro Gln Arg Tyr Ser Phe Ala Lys Val Ser Ala Pro Ile Glu Val
 25 30 35
 20 ccc ggg cta cta gat ctt caa ctg gat tct tac tcc tgg ctg att ggt 860
 Pro Gly Leu Leu Asp Leu Gln Leu Asp Ser Tyr Ser Trp Leu Ile Gly
 40 45 50
 acg cct gag tgg cgt gct cgt cag aag gaa gaa ttc ggc gag gga gcc 908
 Thr Pro Glu Trp Arg Ala Arg Gln Lys Glu Glu Phe Gly Glu Gly Ala
 25 55 60 65
 cgc gta acc agc ggc ctt gag aac att ctc gag gag ctc tcc cca atc 956
 Arg Val Thr Ser Gly Leu Glu Asn Ile Leu Glu Glu Leu Ser Pro Ile
 70 75 80 85
 30 cag gat tac tct gga aac atg tcc ctg agc ctt tcg gag cca cgc ttc 1004
 Gln Asp Tyr Ser Gly Asn Met Ser Leu Ser Leu Ser Glu Pro Arg Phe
 90 95 100
 35 gaa gac gtc aag aac acc att gac gag gcg aaa gaa aag gac atc aac 1052
 Glu Asp Val Lys Asn Thr Ile Asp Glu Ala Lys Glu Lys Asp Ile Asn
 105 110 115
 40 tac gcg gcg cca ctg tat gtg acc gcg gag ttc gtc aac aac acc acc 1100
 Tyr Ala Ala Pro Leu Tyr Val Thr Ala Glu Phe Val Asn Asn Thr Thr
 120 125 130
 45 ggt gaa atc aag tct cag act gtc ttc atc ggc gat ttc cca atg atg 1148
 Gly Glu Ile Lys Ser Gln Thr Val Phe Ile Gly Asp Phe Pro Met Met
 135 140 145
 50 acg gac aag gga acg ttc atc atc aac gga acc gaa cgc gtt gtg gtc 1196
 Thr Asp Lys Gly Thr Phe Ile Ile Asn Gly Thr Glu Arg Val Val Val
 150 155 160 165
 agc cag ctc gtc cgc tcc ccg ggc gtg tac ttt gac cag acc atc gat 1244
 Ser Gln Leu Val Arg Ser Pro Gly Val Tyr Phe Asp Gln Thr Ile Asp
 170 175 180
 55 aag tca act gag cgt cca ctg cac gcc gtg aag gtt att cct tcc cgt 1292
 Lys Ser Thr Glu Arg Pro Leu His Ala Val Lys Val Ile Pro Ser Arg
 185 190 195

	ggt gct tgg ctt gag ttt gac gtc gat aag cgc gat tcg gtt ggt gtt	1340
	Gly Ala Trp Leu Glu Phe Asp Val Asp Lys Arg Asp Ser Val Gly Val	
	200 205 210	
5	cgt att gac cgc aag cgt cgc cag cca gtc acc gta ctg ctg aag gct	1388
	Arg Ile Asp Arg Lys Arg Arg Gln Pro Val Thr Val Leu Leu Lys Ala	
	215 220 225	
10	ctt ggc tgg acc act gag cag atc acc gag cgt ttc ggt ttc tct gaa	1436
	Leu Gly Trp Thr Thr Glu Gln Ile Thr Glu Arg Phe Gly Phe Ser Glu	
	230 235 240 245	
15	atc atg atg tcc acc ctc gag tcc gat ggt gta gca aac acc gat gag	1484
	Ile Met Met Ser Thr Leu Glu Ser Asp Gly Val Ala Asn Thr Asp Glu	
	250 255 260	
	gca ttg ctg gag atc tac cgc aag cag cgt cca ggc gag cag cct acc	1532
	Ala Leu Leu Glu Ile Tyr Arg Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gln Pro Thr	
	265 270 275	
20	cgc gac ctt gcg cag tcc ctc ctg gac aac agc ttc ttc cgt gca aag	1580
	Arg Asp Leu Ala Gln Ser Leu Leu Asp Asn Ser Phe Phe Arg Ala Lys	
	280 285 290	
25	cgc tac gac ctg gct cgc gtt ggt cgt tac aag atc aac cgc aag ctc	1628
	Arg Tyr Asp Leu Ala Arg Val Gly Arg Tyr Lys Ile Asn Arg Lys Leu	
	295 300 305	
30	ggc ctt ggt ggc gac cac gat ggt ttg atg act ctt act gaa gag gac	1676
	Gly Leu Gly Gly Asp His Asp Gly Leu Met Thr Leu Thr Glu Glu Asp	
	310 315 320 325	
35	atc gca acc acc atc gag tac ctg gtg cgt ctg cac gca ggt gag cgc	1724
	Ile Ala Thr Thr Ile Glu Tyr Leu Val Arg Leu His Ala Gly Glu Arg	
	330 335 340	
	gtc atg act tct cca aat ggt gaa gag atc cca gtc gag acc gat gac	1772
	Val Met Thr Ser Pro Asn Gly Glu Ile Pro Val Glu Thr Asp Asp	
	345 350 355	
40	atc gac cac ttt ggt aac cgt cgt ctg cgt acc gtt ggc gaa ctg atc	1820
	Ile Asp His Phe Gly Asn Arg Arg Leu Arg Thr Val Gly Glu Leu Ile	
	360 365 370	
45	cag aac cag gtc cgt gtc ggc ctg tcc cgc atg gag cgc gtt gtt cgt	1868
	Gln Asn Gln Val Arg Val Gly Leu Ser Arg Met Glu Arg Val Val Arg	
	375 380 385	
50	gag cgt atg acc acc cag gat gcg gag tcc att act cct act tcc ttg	1916
	Glu Arg Met Thr Thr Gln Asp Ala Glu Ser Ile Thr Pro Thr Ser Leu	
	390 395 400 405	
55	atc aac gtt cgt cct gtc tct gca gct atc cgt gag ttc ttc gga act	1964
	Ile Asn Val Arg Pro Val Ser Ala Ala Ile Arg Glu Phe Phe Gly Thr	
	410 415 420	
	tcc cag ctg tct cag ttc atg gtc cag aac aac tcc ctg tct ggt ttg	2012
	Ser Gln Leu Ser Gln Phe Met Val Gln Asn Asn Ser Leu Ser Gly Leu	
	425 430 435	

	act cac aag cgt cgt tcg gct ctg ggc ccg ggt ggt ctg tcc cgt	2060
	Thr His Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu Gly Pro Gly Gly Leu Ser Arg	
	440	445
5	450	
	gag cgc gcc ggc atc gag gtt cga gac gtt cac cca tct cac tac ggc	2108
	Glu Arg Ala Gly Ile Glu Val Arg Asp Val His Pro Ser His Tyr Gly	
	455	460
	465	
10	cgt atg tgc cca att gag act ccg gaa ggt cca aac att ggc ctg atc	2156
	Arg Met Cys Pro Ile Glu Thr Pro Glu Gly Pro Asn Ile Gly Leu Ile	
	470	475
	480	485
15	ggt tcc ttg gct tcc tat gct cga gtg aac cca ttc ggt ttc att gag	2204
	Gly Ser Leu Ala Ser Tyr Ala Arg Val Asn Pro Phe Gly Phe Ile Glu	
	490	495
	500	
20	acc cca tac cgt cgc atc atc gac ggc aag ctg acc gac cag att gac	2252
	Thr Pro Tyr Arg Arg Ile Ile Asp Gly Lys Leu Thr Asp Gln Ile Asp	
	505	510
	515	
	tac ctt acc gct gat gag gaa gac cgc ttc gtt gtc gcg cag gca aac	2300
	Tyr Leu Thr Ala Asp Glu Glu Asp Arg Phe Val Val Ala Gln Ala Asn	
	520	525
	530	
25	acg cac tac gac gaa gag ggc aac atc acc gat gag acc gtc act gtt	2348
	Thr His Tyr Asp Glu Glu Gly Asn Ile Thr Asp Glu Thr Val Thr Val	
	535	540
	545	
30	cgt ctg aag gac ggc gac atc gcc atg gtt ggc cgc aac gcg gtt gat	2396
	Arg Leu Lys Asp Gly Asp Ile Ala Met Val Gly Arg Asn Ala Val Asp	
	550	555
	560	565
35	tac atg gac gtt tcc cct cgt cag atg gtt tct gtt ggt acc gcg atg	2444
	Tyr Met Asp Val Ser Pro Arg Gln Met Val Ser Val Gly Thr Ala Met	
	570	575
	580	
40	att cca ttc ctg gag cac gac gat gct aac cgt gca ctg atg ggc gcg	2492
	Ile Pro Phe Leu Glu His Asp Asp Ala Asn Arg Ala Leu Met Gly Ala	
	585	590
	595	
	aac atg cag aag cag gct gtg cca ctg att cgt gcc gag gct cct ttc	2540
	Asn Met Gln Lys Gln Ala Val Pro Leu Ile Arg Ala Glu Ala Pro Phe	
	600	605
	610	
45	615	620
	625	
	gtg ggc acc ggt atg gag cag cgc gca gca tac gac gcc ggc gac ctg	2588
	Val Gly Thr Gly Met Glu Gln Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Gly Asp Leu	
	630	635
	640	645
50	gtt att acc cca gtc gca ggt gtg gta gaa aac gtt tca gct gac ttc	2636
	Val Ile Thr Pro Val Ala Gly Val Val Glu Asn Val Ser Ala Asp Phe	
	650	655
	660	
55	atc acc atc atg gct gat gac ggc aag cgc gaa acc tac ctg ctg cgt	2684
	Ile Thr Ile Met Ala Asp Asp Gly Lys Arg Glu Thr Tyr Leu Leu Arg	

aag ttc cag cgc acc aac cag ggc acc agc tac aac cag aag cct ttg Lys Phe Gln Arg Thr Asn Gln Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Pro Leu 665 670 675	2732
5 gtt aac ttg ggc gag cgc gtt gaa gct ggc cag gtt att gct gat ggt Val Asn Leu Gly Glu Arg Val Glu Ala Gly Gln Val Ile Ala Asp Gly 680 685 690	2780
10 cca ggt acc ttc aat ggt gaa atg tcc ctt ggc cgt aac ctt ctg gtt Pro Gly Thr Phe Asn Gly Glu Met Ser Leu Gly Arg Asn Leu Leu Val 695 700 705	2828
15 gcg ttc atg cct tgg gaa ggc cac aac tac gag gat gcg atc atc ctc Ala Phe Met Pro Trp Glu Gly His Asn Tyr Glu Asp Ala Ile Ile Leu 710 715 720 725	2876
20 aac cag aac atc gtt gag cag gac atc ttg acc tcg atc cac atc gag Asn Gln Asn Ile Val Glu Gln Asp Ile Leu Thr Ser Ile His Ile Glu 730 735 740	2924
25 gag cac gag atc gat gcc cgc gac act aag ctt ggc gcc gaa gaa atc Glu His Glu Ile Asp Ala Arg Asp Thr Lys Leu Gly Ala Glu Glu Ile 745 750 755	2972
30 acc cgc gac atc cct aat gtg tct gaa gaa gtc ctc aag gac ctc gac Thr Arg Asp Ile Pro Asn Val Ser Glu Glu Val Leu Lys Asp Leu Asp 760 765 770	3020
35 gac cgc ggt att gtc cgc atc ggt gct gat gtt cgt gac ggc gac atc Asp Arg Gly Ile Val Arg Ile Gly Ala Asp Val Arg Asp Gly Asp Ile 775 780 785	3068
40 ctg gtc ggt aag gtc acc cct aag ggc gag acc gag ctc acc ccg gaa Leu Val Gly Lys Val Thr Pro Lys Gly Glu Thr Glu Leu Thr Pro Glu 790 795 800 805	3116
45 gag cgc ttg ctg cgc gca atc ttc ggt gag aag gcc cgc gaa gtt cgc Glu Arg Leu Leu Arg Ala Ile Phe Gly Glu Lys Ala Arg Glu Val Arg 810 815 820	3164
50 gat acc tcc atg aag gtg cct cac ggt gag acc ggc aag gtc atc ggc Asp Thr Ser Met Lys Val Pro His Gly Glu Thr Gly Lys Val Ile Gly 825 830 835	3212
55 gtg cgt cac ttc tcc cgc gag gac gac gac gat ctg gct cct ggc gtc Val Arg His Phe Ser Arg Glu Asp Asp Asp Asp Leu Ala Pro Gly Val 840 845 850	3260
60 aac gag atg atc cgt atc tac gtt gct cag aag cgt aag atc cag gac Asn Glu Met Ile Arg Ile Tyr Val Ala Gln Lys Arg Lys Ile Gln Asp 855 860 865	3308
65 ggc gat aag ctc gct ggc cgc cac ggt aac aag ggt gtt gtc ggt aaa Gly Asp Lys Leu Ala Gly Arg His Gly Asn Lys Gly Val Val Gly Lys 870 875 880 885	3356
70 att ttg cct cag gaa gat atg cca ttc ctt cca gac ggc act cct gtt Ile Leu Pro Gln Glu Asp Met Pro Phe Leu Pro Asp Gly Thr Pro Val 890 895 900	3404

	gac atc atc ttg aac acc cac ggt gtt cca cgt cgt atg aac att ggt Asp Ile Ile Leu Asn Thr His Gly Val Pro Arg Arg Met Asn Ile Gly 905	910	915	3452	
5	cag gtt ctt gag acc cac ctt ggc tgg ctg gca tct gct ggt tgg tcc Gln Val Leu Glu Thr His Leu Gly Trp Leu Ala Ser Ala Gly Trp Ser 920	925	930	3500	
10	gtg gat cct gaa gat cct gag aac gct gag ctc gtc aag act ctg cct Val Asp Pro Glu Asp Pro Glu Asn Ala Glu Leu Val Lys Thr Leu Pro 935	940	945	3548	
15	gca gac ctc ctc gag gtt cct gct ggt tcc ttg act gca act cct gtg Ala Asp Leu Leu Glu Val Pro Ala Gly Ser Leu Thr Ala Thr Pro Val 950	955	960	965	3596
20	ttc gac ggt gcg tca aac gaa gag ctc gca ggc ctg ctc gct aat tca Phe Asp Gly Ala Ser Asn Glu Glu Leu Ala Gly Leu Leu Ala Asn Ser 970	975	980	3644	
	cgt cca aac cgc gac ggc gac gtc atg gtt aac gcg gat ggt aaa gca Arg Pro Asn Arg Asp Gly Asp Val Met Val Asn Ala Asp Gly Lys Ala 985	990	995	3692	
25	acg ctt atc gac ggt cgc tcc ggt gag cct tac ccg tac ccg gtt tcc Thr Leu Ile Asp Gly Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Pro Tyr Pro Val Ser 1000	1005	1010	3740	
30	atc ggc tac atg tac atg ctg aag ctg cac cac ctc gtt gac gag aag Ile Gly Tyr Met Tyr Met Leu Lys Leu His His Leu Val Asp Glu Lys 1015	1020	1025	3788	
35	atc cac gca cgt tcc act ggt cct tac tcc atg att acc cag cag cca Ile His Ala Arg Ser Thr Gly Pro Tyr Ser Met Ile Thr Gln Gln Pro 1030	1035	1040	1045	3836
40	ctg ggt ggt aaa gca cag ttc ggt gga cag cgt ttc ggc gaa atg gag Leu Gly Lys Ala Gln Phe Gly Gly Gln Arg Phe Gly Glu Met Glu 1050	1055	1060	3884	
	gtg tgg gca atg cag gca tac ggc gct gcc tac aca ctt cag gag ctg Val Trp Ala Met Gln Ala Tyr Gly Ala Ala Tyr Thr Leu Gln Glu Leu 1065	1070	1075	3932	
45	ctg acc atc aag tct gat gac gtg gtt ggc cgt gtc aag gtc tac gaa Leu Thr Ile Lys Ser Asp Asp Val Val Gly Arg Val Lys Val Tyr Glu 1080	1085	1090	3980	
50	gca att gtg aag ggc gag aac atc ccg gat cca ggt att cct gag tcc Ala Ile Val Lys Gly Glu Asn Ile Pro Asp Pro Gly Ile Pro Glu Ser 1095	1100	1105	4028	
55	ttc aag gtt ctc ctc aag gag ctc cag tcc ttg tgc ctg aac gtg gag Phe Lys Val Leu Leu Lys Glu Leu Gln Ser Leu Cys Leu Asn Val Glu 1110	1115	1120	1125	4076

gtt ctc tcc gca gac ggc act cca atg gag ctc gcg ggt gac gac gac 4124
 Val Leu Ser Ala Asp Gly Thr Pro Met Glu Leu Ala Gly Asp Asp Asp
 1130 1135 1140

5 gac ttc gat cag gca ggc gcc tca ctt ggc atc aac ctg tcc cgt gac 4172
 Asp Phe Asp Gln Ala Gly Ala Ser Leu Gly Ile Asn Leu Ser Arg Asp
 1145 1150 1155

10 gag cgt tcc gac gcc gac acc gca tagcagatca gaaaacaacc gctagaatac 4226
 Glu Arg Ser Asp Ala Asp Thr Ala
 1160 1165

aagccataca tccccggac attgaagaga ttttctgggg ggaaaggag ttttacgtgc 4286

15 tcgacgtaaa cgtcttcgat gagctccgca tcggcctggc caccgcccac gacatccgcc 4346
 gttggtccaa gggtaggtc aagaagccgg agaccatcaa ctaccgaacc ctcaaggctg 4406

20 agaaggacgg tctgttctgc gagcgtatct tcggtccaac tcgactgg gagtgcgcct 4466
 gcggttaagta caagcgtgtc cgctacaagg gcatcatctg tgaacgctgt ggcgttgagg 4526
 tcaccaagtc caaggtgcgc cgtgagcgc tggacacat tgagctcgct gcaccagtaa 4586

25 cccacatttgcgtacttcaag ggcgttccat cacgcctcggtt gacccatgtc 4646
 caaaggacct ggacccatc atctacttcg gtgcgaacat catcaccagc gtggacgaag 4706

30 aggctcgcca cagcgaccag accactcttg aggccagaaat gtttctggag aagaaggacg 4766
 ttgaggcaga cgcagagtct gacattgtcg agcgtgctga aaagctcgaa gaggatcttgc 4826
 ctgaacttga ggcagctggc gctaaggccg acgctcgccg caaggatcgat gctgctgccc 4886

35 ataaggaaat gcagcacatc cgtgagcgtg cacagcgcga aatcgatcgat ctcgatgagg 4946
 tctggcagac cttcatcaag cttgtccaa agcagatgtat ccgcgtatgaa aagctctacg 5006

40 atgaactgat cgaccgctac gaggattact tcaccggtgg tatgggtgca gagtccatttgc 5066
 aggctttgat ccagaacttc gacccatgtc 5099

45 <210> 6
 <211> 1165
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

50 <400> 6
 Val Leu Glu Gly Pro Ile Leu Ala Val Ser Arg Gln Thr Lys Ser Val
 1 5 10 15

Val Asp Ile Pro Gly Ala Pro Gln Arg Tyr Ser Phe Ala Lys Val Ser
 20 25 30

55 Ala Pro Ile Glu Val Pro Gly Leu Leu Asp Leu Gln Leu Asp Ser Tyr
 35 40 45

Ser Trp Leu Ile Gly Thr Pro Glu Trp Arg Ala Arg Gln Lys Glu Glu
 50 55 60

5 Phe Gly Glu Gly Ala Arg Val Thr Ser Gly Leu Glu Asn Ile Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Leu Ser Pro Ile Gln Asp Tyr Ser Gly Asn Met Ser Leu Ser Leu
 85 90 95

10 Ser Glu Pro Arg Phe Glu Asp Val Lys Asn Thr Ile Asp Glu Ala Lys
 100 105 110

Glu Lys Asp Ile Asn Tyr Ala Ala Pro Leu Tyr Val Thr Ala Glu Phe
 15 115 120 125

Val Asn Asn Thr Thr Gly Glu Ile Lys Ser Gln Thr Val Phe Ile Gly
 130 135 140

20 Asp Phe Pro Met Met Thr Asp Lys Gly Thr Phe Ile Ile Asn Gly Thr
 145 150 155 160

Glu Arg Val Val Val Ser Gln Leu Val Arg Ser Pro Gly Val Tyr Phe
 165 170 175

25 Asp Gln Thr Ile Asp Lys Ser Thr Glu Arg Pro Leu His Ala Val Lys
 180 185 190

Val Ile Pro Ser Arg Gly Ala Trp Leu Glu Phe Asp Val Asp Lys Arg
 30 195 200 205

Asp Ser Val Gly Val Arg Ile Asp Arg Lys Arg Arg Gln Pro Val Thr
 210 215 220

35 Val Leu Leu Lys Ala Leu Gly Trp Thr Thr Glu Gln Ile Thr Glu Arg
 225 230 235 240

Phe Gly Phe Ser Glu Ile Met Met Ser Thr Leu Glu Ser Asp Gly Val
 245 250 255

40 Ala Asn Thr Asp Glu Ala Leu Leu Glu Ile Tyr Arg Lys Gln Arg Pro
 260 265 270

Gly Glu Gln Pro Thr Arg Asp Leu Ala Gln Ser Leu Leu Asp Asn Ser
 45 275 280 285

Phe Phe Arg Ala Lys Arg Tyr Asp Leu Ala Arg Val Gly Arg Tyr Lys
 290 295 300

Ile Asn Arg Lys Leu Gly Leu Gly Asp His Asp Gly Leu Met Thr
 50 305 310 315 320

Leu Thr Glu Glu Asp Ile Ala Thr Thr Ile Glu Tyr Leu Val Arg Leu
 325 330 335

55 His Ala Gly Glu Arg Val Met Thr Ser Pro Asn Gly Glu Glu Ile Pro
 340 345 350

Val Glu Thr Asp Asp Ile Asp His Phe Gly Asn Arg Arg Leu Arg Thr
 355 360 365

Val Gly Glu Leu Ile Gln Asn Gln Val Arg Val Gly Leu Ser Arg Met
370 375 380

5 Glu Arg Val Val Arg Glu Arg Met Thr Thr Gln Asp Ala Glu Ser Ile
385 390 395 400

Thr Pro Thr Ser Leu Ile Asn Val Arg Pro Val Ser Ala Ala Ile Arg
405 410 415

10 Glu Phe Phe Gly Thr Ser Gln Leu Ser Gln Phe Met Val Gln Asn Asn
420 425 430

Ser Leu Ser Gly Leu Thr His Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu Gly Pro
15 435 440 445

Gly Gly Leu Ser Arg Glu Arg Ala Gly Ile Glu Val Arg Asp Val His
450 455 460

20 Pro Ser His Tyr Gly Arg Met Cys Pro Ile Glu Thr Pro Glu Gly Pro
465 470 475 480

Asn Ile Gly Leu Ile Gly Ser Leu Ala Ser Tyr Ala Arg Val Asn Pro
485 490 495

25 Phe Gly Phe Ile Glu Thr Pro Tyr Arg Arg Ile Ile Asp Gly Lys Leu
500 505 510

Thr Asp Gln Ile Asp Tyr Leu Thr Ala Asp Glu Glu Asp Arg Phe Val
30 515 520 525

Val Ala Gln Ala Asn Thr His Tyr Asp Glu Glu Gly Asn Ile Thr Asp
530 535 540

35 Glu Thr Val Thr Val Arg Leu Lys Asp Gly Asp Ile Ala Met Val Gly
545 550 555 560

Arg Asn Ala Val Asp Tyr Met Asp Val Ser Pro Arg Gln Met Val Ser
565 570 575

40 Val Gly Thr Ala Met Ile Pro Phe Leu Glu His Asp Asp Ala Asn Arg
580 585 590

Ala Leu Met Gly Ala Asn Met Gln Lys Gln Ala Val Pro Leu Ile Arg
45 595 600 605

Ala Glu Ala Pro Phe Val Gly Thr Gly Met Glu Gln Arg Ala Ala Tyr
610 615 620

50 Asp Ala Gly Asp Leu Val Ile Thr Pro Val Ala Gly Val Val Glu Asn
625 630 635 640

Val Ser Ala Asp Phe Ile Thr Ile Met Ala Asp Asp Gly Lys Arg Glu
645 650 655

55 Thr Tyr Leu Leu Arg Lys Phe Gln Arg Thr Asn Gln Gly Thr Ser Tyr
660 665 670

Asn Gln Lys Pro Leu Val Asn Leu Gly Glu Arg Val Glu Ala Gly Gln
 675 680 685

Val Ile Ala Asp Gly Pro Gly Thr Phe Asn Gly Glu Met Ser Leu Gly
 5 690 695 700

Arg Asn Leu Leu Val Ala Phe Met Pro Trp Glu Gly His Asn Tyr Glu
 705 710 715 720

10 Asp Ala Ile Ile Leu Asn Gln Asn Ile Val Glu Gln Asp Ile Leu Thr
 725 730 735

Ser Ile His Ile Glu Glu His Glu Ile Asp Ala Arg Asp Thr Lys Leu
 740 745 750

15 Gly Ala Glu Glu Ile Thr Arg Asp Ile Pro Asn Val Ser Glu Glu Val
 755 760 765

20 Leu Lys Asp Leu Asp Asp Arg Gly Ile Val Arg Ile Gly Ala Asp Val
 770 775 780

Arg Asp Gly Asp Ile Leu Val Gly Lys Val Thr Pro Lys Gly Glu Thr
 785 790 795 800

25. Glu Leu Thr Pro Glu Glu Arg Leu Leu Arg Ala Ile Phe Gly Glu Lys
 805 810 815

Ala Arg Glu Val Arg Asp Thr Ser Met Lys Val Pro His Gly Glu Thr
 820 825 830

30 Gly Lys Val Ile Gly Val Arg His Phe Ser Arg Glu Asp Asp Asp Asp
 835 840 845

35 Leu Ala Pro Gly Val Asn Glu Met Ile Arg Ile Tyr Val Ala Gln Lys
 850 855 860

Arg Lys Ile Gln Asp Gly Asp Lys Leu Ala Gly Arg His Gly Asn Lys
 865 870 875 880

40 Gly Val Val Gly Lys Ile Leu Pro Gln Glu Asp Met Pro Phe Leu Pro
 885 890 895

Asp Gly Thr Pro Val Asp Ile Ile Leu Asn Thr His Gly Val Pro Arg
 900 905 910

45 Arg Met Asn Ile Gly Gln Val Leu Glu Thr His Leu Gly Trp Leu Ala
 915 920 925

50 Ser Ala Gly Trp Ser Val Asp Pro Glu Asp Pro Glu Asn Ala Glu Leu
 930 935 940

Val Lys Thr Leu Pro Ala Asp Leu Leu Glu Val Pro Ala Gly Ser Leu
 945 950 955 960

55 Thr Ala Thr Pro Val Phe Asp Gly Ala Ser Asn Glu Glu Leu Ala Gly
 965 970 975

Leu Leu Ala Asn Ser Arg Pro Asn Arg Asp Gly Asp Val Met Val Asn
 980 985 990

Ala Asp Gly Lys Ala Thr Leu Ile Asp Gly Arg Ser Gly Glu Pro Tyr
995 1000 1005

5 Pro Tyr Pro Val Ser Ile Gly Tyr Met Tyr Met Leu Lys Leu His His
1010 1015 1020

Leu Val Asp Glu Lys Ile His Ala Arg Ser Thr Gly Pro Tyr Ser Met
025 1030 1035 1040

10 Ile Thr Gln Gln Pro Leu Gly Gly Lys Ala Gln Phe Gly Gly Gln Arg
1045 1050 1055

Phe Gly Glu Met Glu Val Trp Ala Met Gln Ala Tyr Gly Ala Ala Tyr
15 1060 1065 1070

Thr Leu Gln Glu Leu Leu Thr Ile Lys Ser Asp Asp Val Val Gly Arg
1075 1080 1085

20 Val Lys Val Tyr Glu Ala Ile Val Lys Gly Glu Asn Ile Pro Asp Pro
1090 1095 1100

Gly Ile Pro Glu Ser Phe Lys Val Leu Leu Lys Glu Leu Gln Ser Leu
105 1110 1115 1120

25 Cys Leu Asn Val Glu Val Leu Ser Ala Asp Gly Thr Pro Met Glu Leu
1125 1130 1135

Ala Gly Asp Asp Asp Asp Phe Asp Gln Ala Gly Ala Ser Leu Gly Ile
30 1140 1145 1150

Asn Leu Ser Arg Asp Glu Arg Ser Asp Ala Asp Thr Ala
1155 1160 1165

35

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das rpsL-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c)

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des ribosomalen Proteins S12 aufweist.

- 20 2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
- 25 3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
- 25 5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
 - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
 - (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h
gekennzeichnet, daß die Hybridisierung
unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC
durchgeführt wird.
- 10 7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneformen Bakterien, in denen das rpsL-Gen verstärkt,
insbesondere überexprimiert wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h
gekennzeichnet, daß man folgende Schritte
durchführt:
- 20 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man
zumindest das rpsL-Gen oder dafür kodierende
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere
überexprimiert;
- 25 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den
Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
30 gekennzeichnet, daß man Bakterien

einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
5
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das rpsL-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
10
13. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das rpsL-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.
15
14. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die regulatorischen/katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid rpsL kodiert.
20
15. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
25
- 15.1 das für die Dihydridipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,
30
- 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap,

- 15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen *tpi*,
- 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen *pgk*,
- 5 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen *zwf*,
- 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen *pyc*,
- 10 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen *mqa*,
- 15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,
- 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE*,
- 15.10 das für das Zwal-Protein kodierende Gen *zwal*,
- 15 15.11 das für die RNA-Polymerase B kodierende *rpoB*-Gen
verstärkt bzw. überexprimiert.
- 20 16. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck*,
- 25 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi*,
- 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*

- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 abschwächt.
17. Coryneformen Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 5 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
- 10 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für das ribosomale Protein S12 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des rpsL-Gens aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den 15 Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.
- 20 20. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man arrays, micro arrays oder DNA-chips einsetzt.
- 25 21. Aus coryneformen Bakterien stammende DNA, kodierend für ribosomale S12 Proteine, wobei die zugehörigen Aminosäuresequenzen zwischen den Positionen 38 bis 48 in der SEQ ID No. 2 durch Aminosäureaustausch verändert sind.
- 30 22. Aus coryneformen Bakterien stammende DNA, kodierend für ribosomale S12 Proteine, wobei die zugehörigen Aminosäuresequenzen an Position 43 in der SEQ ID No. 2 jede andere proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Lysin enthalten.

23. Aus coryneformen Bakterien stammende DNA, kodierend für ribosomale S12 Proteine, wobei die zugehörigen Aminosäuresequenzen an Position 43 in der SEQ ID No. 2 L-Histidin oder L-Arginin enthalten.

5 24. DNA gemäß Anspruch 23 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß diese für das ribosomale Protein S12 kodiert, dessen Aminosäuresequenz an Position 43 L-Arginin enthält, dargestellt in SEQ ID No. 4.

10 25. DNA gemäß Anspruch 24 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß diese an Position 627 die Nukleobase Guanin enthält, dargestellt in SEQ ID No 3.

15 26. Coryneforme Bakterien die eine DNA gemäß Anspruch 21, 22, 23, 24 oder 25 enthalten.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das rpsL-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.